

# Exhibit B

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
31. Juli 2003 (31.07.2003)

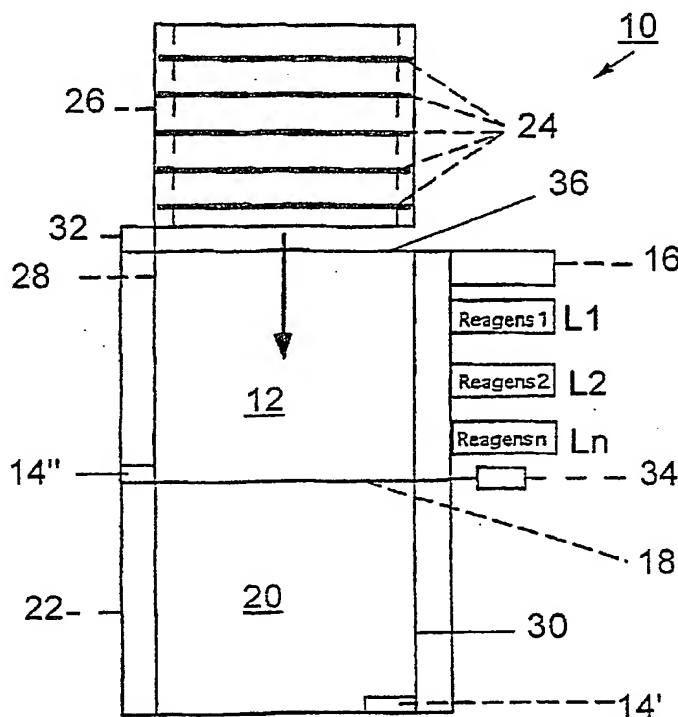
PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/062797 A1**

- |   |                              |   |
|---|------------------------------|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :<br>1/31, B01L 7/00  | G01N 1/30,                   | (71) Anmelder und<br>(72) Erfinder: SCHUBERT, Walter [DE/DE]; Am Mühlen-<br>grund 9, 39175 Biederitz (DE).  |
| (21) Internationales Aktenzeichen:  | PCT/EP03/00357               | (74) Anwälte: HOFSTETTER, Alfons usw.; Balanstrasse 57,<br>81541 München (DE).  |
| (22) Internationales Anmeldedatum:  | 15. Januar 2003 (15.01.2003) | (81) Bestimmungsstaaten (national): CN, JP, SG, US.   |
| (25) Einreichungssprache:   | Deutsch                      | Veröffentlicht:<br>— mit internationalem Recherchenbericht  |
| (26) Veröffentlichungssprache:  | Deutsch                      | Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen<br>Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on<br>Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe<br>der PCT-Gazette verwiesen. |
| (30) Angaben zur Priorität:<br>02001519.4      22. Januar 2002 (22.01.2002) | EP                           |   |

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR PREPARING BIOLOGICAL SAMPLES FOR ANALYSIS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG FÜR DIE PROBENVORBEREITUNG ZUR ANALYSE VON BIOLOGISCHEN PROBEN



REAGENS = REAGENT.

(57) Abstract: The invention relates to a method for preparing biological samples for analysis, comprising the following steps: (a) the biological sample is placed on a two-dimensional support; (b) application of a first protein-precipitating or denaturing first solution L1 to the biological sample or the support at a first temperature T1, for a predetermined first time period Z1; (c) the protein-precipitating or denaturing first solution L1 is then left, or more solution is applied to the biological sample or support, or a protein-precipitating or denaturing second solution L2 is applied to the biological sample or support at a temperature T2, for a predetermined second time period Z2, whereby T2 is lower than T1 and Z2 is longer, equal to or shorter than Z1; and (d) drying of the sample. The invention also relates to a device for carrying out a method for the preparation of biological samples for analysis, in accordance with one of the aforementioned claims, said device (10) comprising at least one chamber (12) for receiving the biological sample or samples that has/have been applied to at least one support and comprising at least one temperature controller (14) for controlling and adjusting the temperature inside the chamber (12).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/062797 A1



---

**(57) Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren für die Probenvorbereitung zur Analyse von biologischen Proben, folgende Schritte umfassend: (a) Aufbringen der biologischen Probe auf einen zweidimensionalen Träger; (b) Aufbringen einer Protein fällenden oder denaturierenden ersten Lösung L1 auf die biologische Probe bzw. den Träger bei einer ersten Temperatur T1 für ein vorbestimmtes erstes Zeitintervall Z1; (c) Belassen oder weiteres Aufbringen der Protein fällenden oder denaturierenden ersten Lösung L1 oder Aufbringen einer Protein fällenden oder denaturierenden zweiten Lösung L2 auf die biologische Probe bzw. den Träger bei einer zweiten Temperatur T2 für ein vorbestimmtes zweites Zeitintervall Z2, wobei T2 niedriger ist als T1 und Z2 länger, gleich oder kürzer ist als Z1; und (d) Trocknen der Probe. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin eine Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens für die Probenvorbereitung zur Analyse von biologischen Proben nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Vorrichtung (10) mindestens eine Kammer (12) zur Aufnahme der auf mindestens einem Träger aufgetragenen biologischen Probe bzw. Proben und mindestens eine Temperaturregelvorrichtung (14) zur Regelung und Steuerung der Temperatur innerhalb der Kammer (12) aufweist.

5

## **Verfahren und Vorrichtung für die Probenvorbereitung zur Analyse von biologischen Proben**

10

### **BESCHREIBUNG:**

- 15 Die Erfindung betrifft ein Verfahren für die Probenvorbereitung zur Analyse von biologischen Proben und eine Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens für die Probenvorbereitung zur Analyse von biologischen Proben.

20 Die qualitative und quantitative Analyse von Proteinen in einer gegebenen Zell- oder Gewebeprobe gewinnt in der Forschung und Industrie seit der Kompletsequenzierung des Genoms des Menschen und anderer Spezies zunehmend an Bedeutung.

25 Im Hinblick auf die protein-chemischen Analysemethoden stehen moderne, sogenannte Large-Scale-Proteomics-Verfahren im Vordergrund. Diese Verfahren beruhen auf einer Aufschlüsselung einer gegebenen Zell- oder Gewebeprobe, einer Extraktion und Denaturierung der Proteine mit Hilfe verschiedener möglicher Reagenzien und der Trennung der einzelnen Proteine mit Hilfe von zum Beispiel zweidimensionalen Gel-Elektrophorese-Verfahren. Jedes einzelne Protein, das in 30 dem Ausgangs-Proteingemisch in ausreichender Menge, Größe und mit hinreichender Wanderungsfähigkeit vorliegt, wird innerhalb solcher Gele als Fleck an einem charakteristischen Ort bezüglich der Größe und der Nettoladung nachgewiesen. In der Praxis der sogenannten Proteomforschung lassen sich auf

- 2 -

diese Weise bis zu mehrere tausend Proteine aus einer Probe trennen. Anhand des Vergleichs verschiedener Zustände eines Gewebes können theoretisch Unterschiede der Proteinexpression durch eine ortsgenaue Überlagerung der einzelnen Gele mit Hilfe geeigneter Software ermittelt werden. Insbesondere sollten dabei neu exprimierte Proteine und die nicht mehr exprimierten oder überexprimierten Proteine anhand des Ortsvergleichs identifizierbar sein.

In der täglichen Analysepraxis ergeben sich aber hinsichtlich dieser Zielsetzung einige bedeutende Limitierungen. So weisen die bekannten Analyseverfahren begrenzte Reproduzierbarkeiten auf, da es zu erheblichen Ungenauigkeiten bei den einzelnen Analyseschritten aufgrund fehlender Automatisierung kommt. So ergeben sich zum Beispiel hinsichtlich der Position einzelner Proteine Abweichungen bis zu einigen Prozent. Hinsichtlich der relativen Menge der Proteine ergeben sich Abweichungen von bis zu zwanzig Prozent.

Neben einer schwierigen technischen Durchführung der bekannten Verfahren ist auch deren Dynamik nicht ausreichend, das heißt sehr selten vorkommende Proteine können nicht gleichzeitig neben sehr häufig vorkommenden dargestellt werden. Diese Limitierungen machen es unmöglich, mit Hilfe einer geeigneten Software, die auf reproduzierbare Positionen der einzelnen Proteine angewiesen ist, eine größere Zahl, von zum Beispiel Gelen, automatisiert zu vergleichen. Die leicht voneinander abweichenden Positionen einzelner Protein-Flecken erhöht die Unsicherheit von Vergleichsanalysen. In der Proteomforschung ist man aber auf den Vergleich sehr großer Zell-Gewebemengen angewiesen, so dass die genannten Beschränkungen der bekannten Verfahren nicht tolerierbar sind.

Ein wesentlicher Grund für die Variabilität bzw. die Ungenauigkeiten und begrenzten Reproduzierbarkeiten der bekannten Analyseverfahren besteht insbesondere auch in der nicht standardisierten Probenvorbereitung.

Aufgabe der Erfindung ist es daher ein Verfahren für die Probenvorbereitung zur Analyse von biologischen Proben weiterzubilden und bereitzustellen, das eine

homogene und standardisierte und gegebenenfalls vollständig automatisierte Probenvorbereitung gewährleistet.

Es ist weiterhin Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine entsprechende  
5 Vorrichtung zur Durchführung des neuen Verfahrens für die Probenvorbereitung zur Analyse von biologischen Proben bereitzustellen.

Diese Aufgaben werden gelöst durch ein Verfahren gemäß den Merkmalen des Anspruchs 1 und eine Vorrichtung gemäß den Merkmalen des Anspruchs 11.

10 Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen beschrieben.

Bei einem erfindungsgemäßen Verfahren für die Probenvorbereitung zur Analyse von biologischen Proben werden folgenden Schritte ausgeführt: a) Aufbringen der  
15 biologischen Probe auf einen zweidimensionalen Träger; b) Aufbringen einer Protein fällenden oder denaturierenden ersten Lösung L1 auf die biologische Probe bzw. den Träger bei einer ersten Temperatur T1 für ein vorbestimmtes erstes Zeitintervall Z1; c) Belassen oder weiteres Aufbringen der Protein fällenden oder denaturierenden ersten Lösung L1 oder Aufbringen einer Protein fällenden  
20 oder denaturierenden zweiten Lösung L2 auf die biologische Probe bzw. den Träger bei einer zweiten Temperatur T2 für ein vorbestimmtes zweites Zeitintervall Z2, wobei T2 niedriger ist als T1 und Z2 länger, gleich oder kürzer ist als Z1, und d) Trocknen der Probe. Durch das erfindungsgemäße Probenvorbereitungsverfahren ist gewährleistet, dass eine homogene,  
25 hochstandardisierte Probenvorbereitung durchgeführt wird und entsprechend homogene Proben geschaffen werden. Infolgedessen ist es möglich, dass mittels entsprechender Computerprogramme die zu analysierenden und zu untersuchenden Proteine signifikant besser erkannt und quantifiziert werden können. Messungen haben gezeigt, dass die Irrtumswahrscheinlichkeit der  
30 Proteinerkennung um den Faktor 3 bis 4 sinkt. Zudem steigt die Anzahl der automatisch erkannten Proteine um mindestens 16 %. Schließlich erlaubt das neue Probenvorbereitungsverfahren eine vollständige Automatisierung der

Probengewinnung und damit die Möglichkeit, quantitative Ergebnisse zwischen verschiedenen Labors zu vergleichen.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt  
5 zwischen den Verfahrensschritten a) und b) als Verfahrensschritt a1) und/oder  
zwischen den Verfahrensschritten b) und a) als Verfahrensschritt b1) ein  
Trocknen der Probe. Es hat sich gezeigt, dass hierdurch eine weitere  
Homogenisierung und auch Konzentrierung der zu untersuchenden biologischen  
Probe erfolgt. Dabei kann das Trocknen gemäß den Verfahrensschritten a1), b1)  
10 oder d) mittels einer Luft- oder Vakuumtrocknung erfolgen.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens  
erfolgt nach den Verfahrensschritten a) oder a1) als Verfahrensschritt b2) ein  
Einfrieren der Probe. Auch hierdurch läßt sich vorteilhafterweise eine homogenere  
15 Proteinkonzentration und eine stabilere Proteinfällung erzielen. Die biologische  
Probe kann dabei eine Zell- oder Gewebeprobe oder ein Gemisch von Proteinen  
oder Nukleinsäuren oder ein Gemisch von Makromolekülen bestehend aus  
Proteinen und/oder Kohlehydraten und/oder Fetten und/oder Nukleinsäuren sein.

20 In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens  
sind die Lösungen L1 und/oder L2 organische Lösungsmittel und/oder Lösungen  
mit kritischen pH-Werten und/oder Lösungen mit kritischen Ionenkonzentrationen  
und/oder Salzlösungen und/oder Metallionen enthaltende Lösungen. Besonders  
vorteilhaft haben sich für die Durchführung des erfindungsgemäßen  
25 Probevorbereitungsverfahrens die organischen Lösungsmittel Methanol, Äthanol,  
Butanol und Aceton erwiesen. Als Salzlösungen finden insbesondere gelöste  
Salze der Pikrinsäure, der Gallusgerbsäure, der Wolframsäure, der  
Molybdänsäure, der Trichloressigsäure, der Perchlorsäure und der  
Sulfosalicylsäure Verwendung. Als vorteilhafter Temperaturbereich T1 hat sich ein  
30 Bereich zwischen -10°C und 60°C erwiesen.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens

werden die biologischen Proben nach dem Verfahrensschritt d) einem Protein- und/oder Nukleinsäurebestimmungsverfahren und/oder einem proteinchemischen Trennverfahren und/oder einem Verfahren zur in Situ Analyse von Zellstrukturen zugeführt.

5

Eine erfindungsgemäße Vorrichtung zur Durchführung des beschriebenen Verfahrens für die Probenvorbereitung zur Analyse von biologischen Proben weist mindestens eine Kammer zur Aufnahme der auf mindestens einem Träger aufgebracht biologischen Probe bzw. Proben und mindestens eine

10 Temperaturregelvorrichtung zur Regelung und Steuerung der Temperatur innerhalb der Kammer auf. Dadurch ist vorteilhafterweise gewährleistet, dass die aufzubereitende biologische Probe unterschiedlichen Temperaturbereichen innerhalb der Kammer ausgesetzt wird.

15

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind mehrere Kammern in Reihe und hintereinander angeordnet. Es ist aber auch möglich, dass mehrere Kammern übereinander angeordnet sind, oder dass innerhalb einer einzelnen Kammer mindestens eine Trennwand angeordnet ist. Durch die Ausbildung von mehreren Kammern ist es vorteilhafterweise möglich,

20 jeder Kammer einen entsprechenden Temperaturbereich oder anderen Reaktionsbereich zuzuweisen. Dadurch erhöht sich der Probendurchsatz, da z. B. ein Abkühlen oder ein Aufheizen einer einzelnen Kammer zur Erlangung unterschiedlicher Temperaturbereiche nicht notwendig ist.

25

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind mehrere Träger auf einem oder mehreren Probeschlitten angeordnet. Auch dies führt zu einer signifikanten Erhöhung des Probendurchsatzes. Dabei können die einzelnen Verfahrensschritte durch die erfindungsgemäße Vorrichtung manuell, halbautomatisch oder automatisch ausgeführt und gesteuert werden.

30

Weitere Einzelheiten, Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus den in den folgenden Figuren dargestellten und beschriebenen Ausführungsbeispiele:

Es zeigen

- 5      Figur 1      eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Durchführung für die Probenvorbereitung zur Analyse von biologischen Proben gemäß einer ersten Ausführungsform;
- 10      Figur 2      eine schematische Darstellung der Vorrichtung gemäß Figur 1 und einem in einer ersten Kammer eingefahrenen Probeschlitten, und
- 15      Figur 3      eine schematische Darstellung der Vorrichtung gemäß Figur 1 mit dem Probeschlitten innerhalb einer zweiten Kammer;
- 20      Figur 4      eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Durchführung eines Probenvorbereitungsverfahrens zur Analyse von biologischen Proben gemäß einer zweiten Ausführungsform; und
- 25      Figur 5      eine schematische Darstellung der Funktionsweise der Vorrichtung gemäß Figur 4.

Figur 1 zeigt in einer schematischen Darstellung eine Vorrichtung 10 zur Durchführung eines Verfahrens für die Probenvorbereitung zur Analyse von biologischen Proben mit einer ersten Kammer 12 und einer zweiten Kammer 20, die sich innerhalb eines Gehäuses 22 befinden. In die erste Kammer 12 und in die zweite Kammer 20 ist ein Probeschlitten 26 mit einer Vielzahl von Trägern 24, auf die biologische Proben aufgebracht sind, über die Schienen 28, 30 ein- und ausfahrbar. Die Bewegung des Probeschlittens 26 erfolgt dabei über den ersten Motor 32.

Desweiteren erkennt man, dass das Gehäuse 22, bzw. die erste Kammer 12



mittels eines Deckels 36 verschließbar ist. Die erste Kammer 12 ist zudem mit einer Vakuumpumpe 16 sowie mehreren Anschlüssen zum Einbringen unterschiedlicher Protein fällender oder denaturierender Lösungen L1, L2, Ln ausgestaltet. Die Anschlüsse sind dabei derart ausgebildet, dass ein Ein- und ein Ausbringen der Lösungen aus den Kammern 12, 20 erfolgen kann. Desweiteren erkennt man, dass die erste Kammer 12 von der zweiten Kammer 20 mittels einer bewegbaren Trennwand 18 getrennt ist. Die Bewegung der Trennwand 18 wird über einen zweiten Motor 34 gesteuert. Zur Regelung der Temperatur innerhalb der Kammern 12, 20 ist im Bereich der zweiten Kammer 20 eine Temperaturregelvorrichtung 14' angeordnet. Optional kann eine entsprechende Temperaturregelvorrichtung 14'' auch noch in der ersten Kammer 12 angeordnet sein. Die Temperatur innerhalb der Kammern 12, 20 kann dabei innerhalb eines Temperaturbereichs zwischen -10°C und 60°C eingestellt werden. Neben der bereits erwähnten automatischen bzw. motorischen Entfernung der Trennwand 18 kann dies natürlich auch manuell durchgeführt werden.

Es ist aber auch möglich, dass an Stelle der beiden Kammern 12, 20 lediglich eine einzelne Kammer vorgesehen ist (nicht dargestellt).

Im Folgenden wird die Funktionsweise des hier beschriebenen ersten Ausführungsbeispiels anhand der Figuren 1 bis 3 näher erläutert.

Im Falle der vollautomatischen Steuerung der Vorrichtung 10 bewegt der erste Motor 32 die Schlittenbox 26 in programmierten Zeitintervallen Z1, Z2 von der ersten Kammer 12 in die zweite Kammer 20 und von der zweiten Kammer 20 zurück in die erste Kammer 12. Dieser Vorgang ist dabei beliebig oft wiederholbar. Durch Aktivierung der Vakuumpumpe 16 kann bei je nach Stellung der Trennwand 18 entweder in der Kammer 12 oder in beiden Kammern 12, 20 ein Vakuum erzeugt werden. Die Erzeugung des Vakuums dient dabei zur Trocknung der Proben auf den Trägern 24 bzw. in dem Probeschlitten 26. Entsprechendes gilt für die Zufuhr und Absaugen der Lösungen L1, L2, Ln. Auch hier kann in Abhängigkeit von der Stellung der Trennwand 18 entweder nur die

erste Kammer 12 oder beide Kammern 12, 20 mit den entsprechenden Lösungen L1, L2, Ln gefüllt und entleert werden.

In einem ersten Verfahrensschritt a) werden die biologischen Proben auf einem  
5 zweidimensionalen Träger 24 aufgebracht. Bei den biologischen Proben handelt  
es sich üblicherweise um eine Zell- oder Gewebeprobe oder ein Gemisch von  
Proteinen oder Nukleinsäuren oder ein Gemisch von Makromolekülen bestehend  
aus Proteinen und/oder Kohlehydraten und/oder Fetten und/oder Nukleinsäuren.  
So können beispielhaft Zellen aus einer Zellkultur in einem Puffer aufgenommen  
10 werden. Dabei wird zum Beispiel die Zelldichte auf  $3 \times 10^8$  Zellen eingestellt. Es  
kann aber auch ein Kryostat-Gewebeschnitt als Probe verwendet werden. Die  
Wahl der Anzahl der Zellen oder die Anzahl der Gewebeschnitte hängt von der  
Zielsetzung ab, das heißt welchem weiteren Verfahren die biologischen Proben  
nach Beendigung der Probenvorbereitung zugeführt werden. Es kann sich dabei  
15 üblicherweise um ein Protein- und/oder Nukleinsäurebestimmungsverfahren  
und/oder ein protein-chemisches Trennverfahren und/oder einem Verfahren zur in  
Situ Analyse von Zellstrukturen handeln. Die im Puffer gelösten Zellen werden mit  
Hilfe einer Pipette gleichmäßig auf den Träger 24 aufgetragen. Alternativ werden  
ein oder mehrere Gewebeschnitte auf den Träger 24 aufgenommen. Je nach  
20 Größe des Probeschlittens 26 können so eine Vielzahl von Trägern 24  
aufgenommen werden. Vor dem Einfahren des Probeschlittens 26 in die  
Vorrichtung 10 wird die Trennwand 18 durch Zug nach außen verschoben, so  
dass die zweite Kammer 20 von der über ihr angeordneten ersten Kammer 12  
aus zugänglich wird. Die zweite Kammer 20 wird dann mit der ersten Protein  
25 fällenden oder denaturierenden Lösung L1 bis knapp an den oberen Kammerrand  
gefüllt. Bei dem hier beschriebenen Ausführungsbeispiel besteht die erste Lösung  
L1 aus einem organischen Lösungsmittel, zum Beispiel Methanol, Äthanol,  
Butanol oder Aceton. Es ist aber auch möglich, dass die Lösungen L1 und L2  
nicht nur aus organischen Lösungsmitteln, sondern auch aus Lösungen mit  
30 kritischen pH-Werten und/oder Lösungen mit kritischen Ionenkonzentrationen  
und/oder Salzlösungen und/oder Metallionen enthaltende Lösungen bestehen.  
Die Salzlösungen können dabei gelöste Salze der Pikrinsäure, der

Gallusgerbsäure, der Wolframsäure, der Molybdänsäure, der Trichloressigsäure, der Perchlorsäure oder der Sulfosalicylsäure enthalten.

In einem nächsten Arbeitsschritt wird die Trennwand 18 wieder in ihre Ausgangsposition zurückgeschoben, das heißt in eine Abschlußposition zur Trennung der ersten Kammer 12 von der zweiten Kammer 20. Nunmehr wird die Schlittenbox 26 in die Schienen 28, 30 der Vorrichtung 10 eingesetzt und in die erste Kammer 12 eingefahren. Desweiteren wird der Deckel 36 der Vorrichtung 10 verschlossen. Nunmehr wird in einem weiteren Arbeitsschritt mit Hilfe der Vakuumpumpe 16 ein Vakuum in der ersten Kammer 12 erzeugt. Dadurch werden die biologischen Proben gemäß einem Verfahrensschritt a1) ein erstes Mal getrocknet. Nach Beendigung dieses Trocknungsvorganges a1) wird das Vakuum aus der ersten Kammer 12 entfernt. Schließlich wird die Trennwand 18 zwischen der ersten Kammer 12 und der zweiten Kammer 20 wiederum entfernt und die Schlittenbox 26 in die mit der ersten Lösung L1 gefüllte zweite Kammer 20 abgesenkt. Dadurch erfolgt ein Aufbringen der Protein fällenden oder denaturierenden ersten Lösung L1 auf die biologischen Proben bzw. die Träger 24 bei einer ersten Temperatur T1, die im vorliegenden Fall Raumtemperatur darstellt. Durch den Kontakt mit dem organischen Lösungsmittel L1 wird den Proteinen der Proben Wasser aus dem Hydratationsmantel entzogen. Nach einem vorbestimmten Zeitintervall Z1, welches zum Beispiel 10 Sekunden betragen kann, wird der Schlitten 26 wieder in die Kammer 12 gezogen. Damit ist der Verfahrensschritt b) beendet. Aufgrund der sehr kurzen Einwirkungszeit kommt es nur zu einem partiellen, schonenden Wasserentzug, so dass die räumliche Struktur der Proteine in den Zellen nicht oder nur unwesentlich beeinflusst wird. Auf diese Weise werden die Proteine für den folgenden Verfahrensschritt c) homogen zugänglich. Vor der Durchführung des Verfahrensschrittes c) wird die Trennwand 18 wieder eingeschoben, so dass es wieder zu einer Trennung der beiden Kammern 10, 20 kommt. Gemäß einem Verfahrensschritt b1) erfolgt nunmehr wiederum ein Trocknen der Probe mit Hilfe der Vakuumpumpe 16. Schließlich wird nach Beendigung des Trocknungsvorganges und Entfernung des Vakuums aus der ersten Kammer 12

wiederum die Trennwand 18 zwischen den Kammern 10, 20 entfernt.

Im folgenden Arbeitsschritt wird über die Temperaturregelvorrichtung 14' die Temperatur innerhalb der Kammern 10, 20 auf  $-20^{\circ}\text{C}$  abgesenkt und eingestellt.

5 Da die biologischen Proben innerhalb der Gasphase des organischen Lösungsmittels L1 in der ersten Kammer 12 angeordnet sind, werden diese gemäß einem Verfahrensschritt b2) eingefroren. Es ist auch möglich, die Proben durch die Zufuhr von flüssigem Stickstoff einzufrieren. Entsprechendes gilt für die Zufuhr von flüssigem Isopentan bei zirka  $-130^{\circ}\text{C}$ . Diese Flüssigkeiten müssen  
10 anschließend wieder aus dem System entfernt werden. In der zweiten Kammer 20 liegt das organische Lösungsmittel L1 aufgrund des üblicherweise wesentlich niedrigeren Gefrierpunkts in flüssigem Zustand vor. Dies gilt insbesondere für die Verwendung von Aceton als organischem Lösungsmittel. Anschließend wird die Schlittenbox 26 mit den biologischen Proben in die zweite Kammer 20 abgesenkt,  
15 so dass es gemäß dem Verfahrensschritt c) zu einem weiteren Aufbringen der Protein fällenden oder denaturierenden ersten Lösung L1 auf die biologische Probe bzw. den Träger bei der zweiten Temperatur T2 kommt. Die Proben verbleiben nunmehr für ein vorbestimmtes zweites Zeitintervall Z2, was in der beschriebenen Ausführungsform zirka 10 Minuten betragen kann, in der zweiten  
20 Kammer 20. Durch das zusätzliche Aufbringen der ersten Lösung L1 bei einer niedrigen Temperatur T2 erfolgt eine schonende, aufgrund des vorbereitenden Verfahrensschrittes b) homogene und komplette Extraktion des Wassermantels der zellulären Proteine in Situ mit einer weitgehenden Erhaltung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen und Proteinkomplexen der behandelten  
25 biologischen Probe.

Anschließend wird die Schlittenbox 26 wieder in die erste Kammer 12 eingefahren, wobei die Trennwand wieder zwischen die Kammern 12, 20 geschoben und arretiert wird. In einem abschließenden Verfahrensschritt d)  
30 werden nunmehr die fertig vorbereiteten Proben getrocknet. Dies erfolgt wiederum mit Hilfe der Vakuumpumpe 16. Es ist aber auch möglich, dass das Trocknen der Proben mittels Lufttrocknung erfolgt.

Die Ausgestaltung der Vorrichtung 10 läßt es aber auch zu, dass nicht nur eine Lösung L1 verwendet wird, sondern eine Vielzahl unterschiedlicher Lösungen L2 bis Ln sequenziell oder gleichzeitig eingefüllt und wieder abgesaugt werden.

5

Es ist aber auch möglich, dass bei der Vorrichtung 10 auf die Trennwand 18 verzichtet wird. In diesem Fall besteht die Vorrichtung 10 nur aus einer Kammer 12 (nicht dargestellt) und einer Temperaturregelungsvorrichtung 14'. Die obere Hälfte der Kammer 12 ist dabei für die Gasphase der einzubringenden und abzusaugenden Lösungen L1, L2 bis Ln, die untere Hälfte für die Flüssigkeitsphase dieser Lösungen vorgesehen. Der gesamte Vorgang wird manuell in vorgegebenen Zeitintervallen gesteuert. Auch auf die Vakuumpumpe und die Motoren 32, 34 kann bei dieser Version der Vorrichtung 10 verzichtet werden.

15

Desweiteren ist es möglich durch die Variation der Höhe der Kammern 12, 20 der in den Figuren 1 bis 3 dargestellten Vorrichtung 10 unterschiedliche Schlittenboxen 26 mit variabler Aufnahmekapazität bezüglich der Anzahl von Trägern 24 zu verwenden. Dadurch wird die Zahl parallel verarbeitbarer Proben erhöht. So können zum Beispiel pro Vorrichtung 10 zwischen zehn und fünfzig Proben gleichzeitig verarbeitet werden. Zudem ist es möglich, durch ein paralleles Betreiben der Vorrichtung 10 die Anzahl der zu bearbeitenden Proben beliebig zu steigern. Dabei kann zum Beispiel eine einzelne Vakuumpumpe 16 über entsprechende Anschlüsse mit einer Vielzahl von Vorrichtungen 10 verbunden sein.

25

Figur 4 zeigt in einer schematischen Darstellung eine Vorrichtung zur Durchführung eines Probenvorbereitungsverfahrens zur Analyse von biologischen Proben gemäß einem zweiten Ausführungsbeispiel. Man erkennt, dass mehrere Kammern 1, 2, 3 ...,n in Reihe und hintereinander angeordnet sind. Dabei sind die einzelnen Kammern 1, 2, 3 ...,n mit entsprechenden Deckeln D1, D2, D3 ...,Dn verschließbar.

30

Im Folgenden wird die hier dargestellte zweite Ausführungsform näher anhand ihrer Funktionsweise beschrieben. So wird eine Schlittenbox A mit den darin enthaltenden Proben bzw. den Proben aufweisenden Trägern in die Schienen B eingesetzt und über der Kammer 1 plaziert. Danach wird die Schlittenbox A in die Kammer 1 abgesenkt und der Kammerdeckel D1 wird mittels der Führungsschiene C über die Kammer 1 geschoben. In der Kammer 1 wird daran anschließend ein Vakuum erzeugt. Nach Beendigung des Vakuum-Trocknungsvorganges und der Luftflutung der Kammer 1 wird der Deckel D1 in seine Ausgangsposition zurückgefahren. Die Schlittenbox A kann dann aus der Kammer 1 wieder in die Schienenführung B zurückgehoben werden. Nach einem Verfahren der Schlittenbox A bis über die Kammer 2 wird diese in die Kammer 2 abgesenkt. Ein Deckel D2 verschließt wiederum die Kammer 2. In der Kammer 2 erfolgt das Aufbringen der Protein fällenden oder denaturierenden ersten Lösung L1 gemäß Verfahrensschritt b). Nach Ausbringen des Probeschlittens A aus der Kammer 2 und ein entsprechendes Einbringen des Probeschlittens A in die Kammer 3 werden die Proben in der Kammer 3 gemäß dem Verfahrensschritt b1) getrocknet. Die Kammer 4 dient zur Durchführung des Verfahrensschrittes c), das heißt einer weiteren Aufbringung einer Protein fällenden oder denaturierenden Lösung bei einer zweiten Temperatur T2, die niedriger ist als die erste Temperatur T1, die im vorliegenden Fall in der Kammer 2 vorgeherrscht hat. Die Kammer 5 dient bei der dargestellten Vorrichtung als Vakuumkammer für die weitere Probentrocknung gemäß Verfahrensschritt d). Alle weiteren Kammern können für die weitere Probenbehandlung verwendet werden. So kann zum Beispiel in Kammer 6 ein Puffer oder eine zweite Lösung L2 auf die Proben aufgetragen werden. Entsprechendes gilt für die Kammern 7 bis 9 mit weiteren Pufferlösungen oder weiteren Protein fällenden oder denaturierenden Lösungen. Zudem können Kammern für die Asservierung der Proben nach einem Durchlauf ausgebildet sein. Desweiteren können Kammern einen sogenannten "Cell/Tissue-Sampler" enthalten, der die behandelten Proben von dem Träger in ein Reagenzglas oder ein Zentrifugenröhrchen aufnimmt.

Man erkennt, dass durch die lineare Vorrichtung gemäß der zweiten Ausführung dieselben Arbeitsschritte wie in den Figuren 1 bis 3 dargestellten Vorrichtung 10 ausgeführt werden können. Jedoch werden die einzelnen Reaktionen in getrennten, für jede Reaktion spezifischen Kammern 1,2, 3 ...,n durchgeführt  
5 (vergleiche auch Figur 5).

In einer weiteren, nicht dargestellten Ausführungsform können in die einzelnen Kammern der Vorrichtung auch innerhalb eines sogenannten Karussells kreisförmig angeordnet sein.

5

10

ANSPRÜCHE:

15

1. Verfahren für die Probenvorbereitung zur Analyse von biologischen Proben, folgende Schritte umfassend:

20

- a) Aufbringen der biologischen Probe auf einen zweidimensionalen Träger;
- b) Aufbringen einer Protein fällenden oder denaturierenden ersten Lösung L1 auf die biologische Probe bzw. den Träger bei einer ersten Temperatur T1 für ein vorbestimmtes erstes Zeitintervall Z1;

25

- c) Belassen oder weiteres Aufbringen der Protein fällenden oder denaturierenden ersten Lösung L1 oder Aufbringen einer Protein fällenden oder denaturierenden zweiten Lösung L2 auf die biologische Probe bzw. den Träger bei einer zweiten Temperatur T2 für ein vorbestimmtes zweites Zeitintervall Z2, wobei T2 niedriger ist als T1 und Z2 länger, gleich oder kürzer ist als Z1; und

30

- d) Trocknen der Probe.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,



daß zwischen den Verfahrensschritten a) und b) als Verfahrensschritt a1) und/oder zwischen den Verfahrensschritten b) und c) als Verfahrensschritt b1) ein Trocknen der Probe erfolgt.

- 5     3.     Verfahren nach Anspruch 2,  
         dadurch gekennzeichnet  
         daß das Trocknen der Probe mittels einer Luft- oder Vakuumtrocknung  
         erfolgt.
- 10    4.     Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
         dadurch gekennzeichnet,  
         daß nach den Verfahrensschritten b) oder b1) als Verfahrensschritt b2) ein  
         Einfrieren der Probe erfolgt.
- 15    5.     Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
         dadurch gekennzeichnet,  
         daß die biologische Probe eine Zell- oder Gewebeprobe oder ein Gemisch  
         von Proteinen oder Nukleinsäuren oder ein Gemisch von Makromolekülen  
         bestehend aus Proteinen und/oder Kohlehydraten und/oder Fetten  
20           und/oder Nukleinsäuren ist.
6.     Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
         dadurch gekennzeichnet,  
         daß die Lösungen L1 und/oder L2 organische Lösungsmittel und/oder  
25           Lösungen mit kritischen pH-Werten und/oder Lösungen mit kritischen  
         Ionenkonzentrationen und/oder Salzlösungen und/oder Metallionen  
         enthaltende Lösungen sind.
7.     Verfahren nach Anspruch 6,  
         dadurch gekennzeichnet,  
30           daß die organischen Lösungsmittel Methanol und/oder Äthanol und/oder  
         Butanol und/oder Aceton sind.

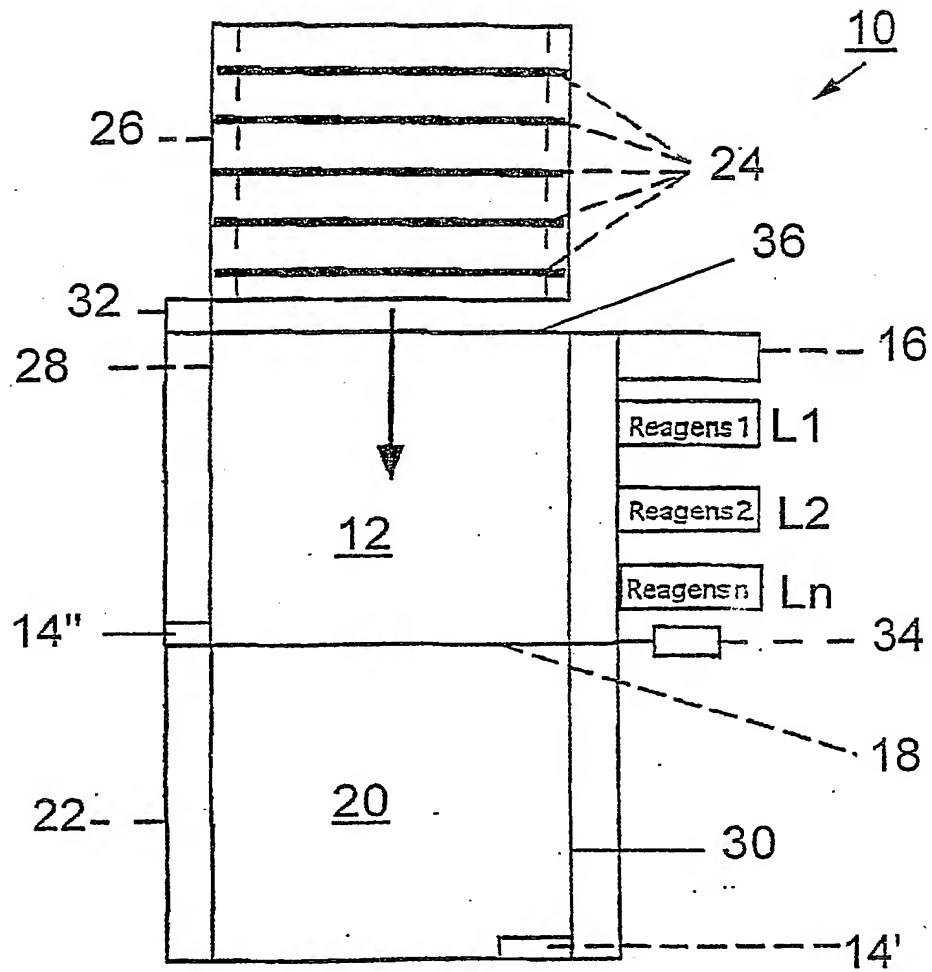
8. Verfahren nach Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Salzlösungen gelöste Salze der Pikrinsäure und/oder der  
5 Gallusgerbsäure und/oder der Wolframsäure und/oder der Molybdänsäure  
und/oder der Trichloressigsäure und/oder der Perchlorsäure und/oder der  
Sulfosalicylsäure enthalten.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
10 dadurch gekennzeichnet,  
daß T1 einen Temperaturbereich zwischen  $-10^{\circ}\text{C}$  bis  $60^{\circ}\text{C}$  umfasst.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
15 daß die biologischen Proben nach dem Verfahrensschritt d) einem Protein-  
und/oder Nukleinsäurebestimmungsverfahren und/oder einem protein-  
chemischen Trennverfahren und/oder einem Verfahren zur in Situ Analyse  
von Zellstrukturen zugeführt werden.
- 20 11. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens für die Probenvorbereitung  
zur Analyse von biologischen Proben nach einem der vorhergehenden  
Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Vorrichtung (10) mindestens eine Kammer (12, 20) zur Aufnahme  
25 der auf mindestens einem Träger (24) aufgetragenen biologischen Probe  
bzw. Proben und mindestens eine Temperaturregelvorrichtung (14', 14'')  
zur Regelung und Steuerung der Temperatur innerhalb der Kammer (12,  
20). aufweist.
- 30 12. Vorrichtung nach Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Kammer (12) mit einem Deckel (36) verschließbar ist.

13. Vorrichtung nach Anspruch 11 oder 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Vorrichtung (10) mindestens eine Vakuumpumpe (16) zur  
Erzeugung eines Vakuums innerhalb der Kammer (12,20) aufweist.
14. Vorrichtung nach Anspruch 11, 12 oder 13,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß innerhalb der Kammer (12, 20) mindestens eine Trennwand (18)  
angeordnet ist.
15. Vorrichtung nach Anspruch 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Trennwand (18) manuell oder automatisch entfernt oder  
verschoben werden kann.
16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 15,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß mehrere Kammern (1, 2, 3 ..., n) in Reihe und hintereinander  
angeordnet sind.
17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 15,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß mehrere Kammern (12, 20) übereinander angeordnet sind.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß mehrere Träger (24) auf einem oder mehreren Probenschlitten (26)  
angeordnet sind.
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 18,  
dadurch gekennzeichnet,

- 18 -

daß die einzelnen Verfahrensschritte durch die Vorrichtung (10) manuell, halbautomatisch oder automatisch ausgeführt und gesteuert werden.

Fig. 1:



2 / 3

Fig. 2:

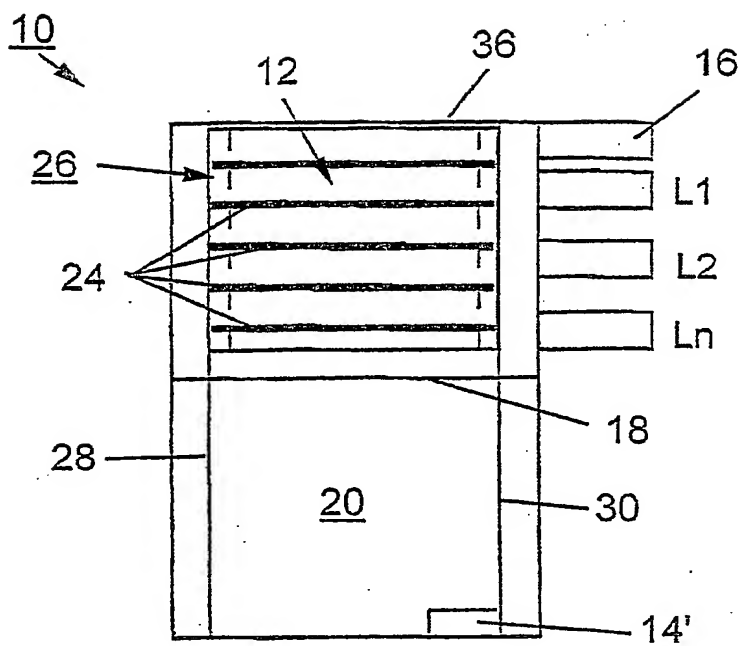
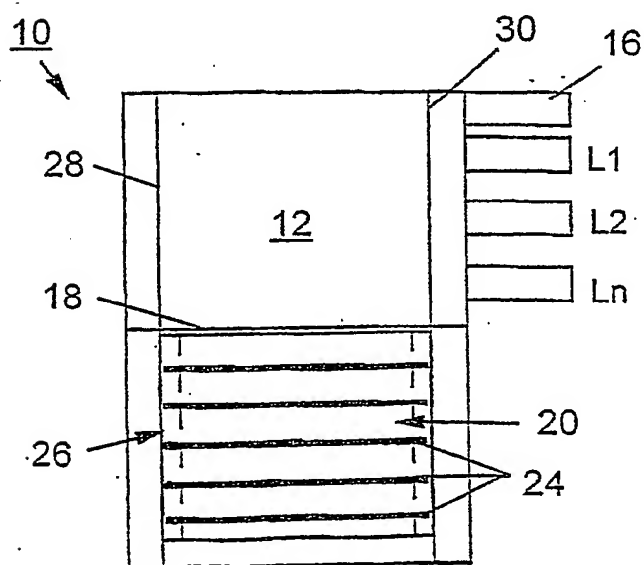


Fig. 3:



3 / 3

Fig. 4:

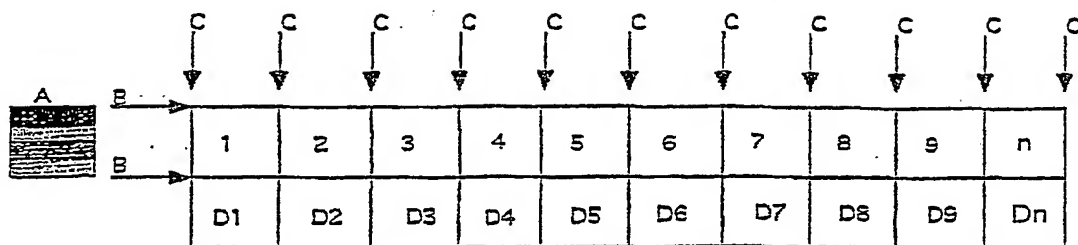
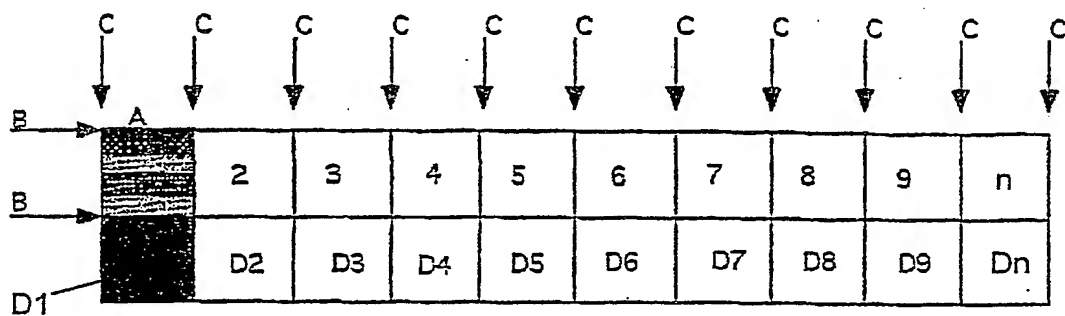
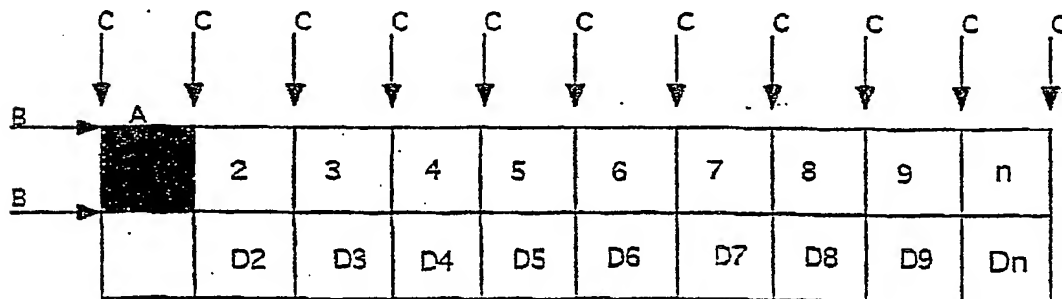


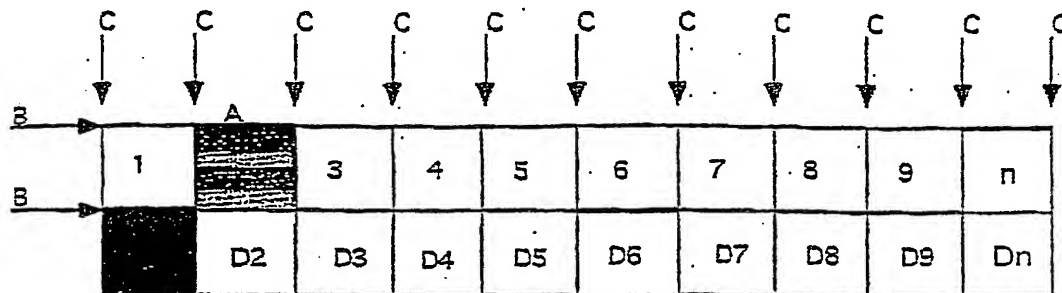
Fig. 5:



Arbeitsschritt 1



Arbeitsschritt 2



Arbeitsschritt 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No  
PCT/EP 03/00357

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N1/30 G01N1/31 B01L7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 93 19207 A (GENE TEC CORP) 30 September 1993 (1993-09-30) page 8, line 27 -page 12, line 31; figure 5	11,12 1-10, 13-19
X A	US 6 300 124 B1 (BLUMENFELD MARTIN ET AL) 9 October 2001 (2001-10-09) the whole document	11,12 1-10, 13-19
X	US 5 451 500 A (STAPLETON MARILYN J) 19 September 1995 (1995-09-19) the whole document	11,12

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 March 2003

Date of mailing of the international search report

18/03/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thomte, M



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 03/00357

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9319207	A	30-09-1993	US 5346672 A	13-09-1994
			US 5281516 A	25-01-1994
			EP 0632839 A1	11-01-1995
			WO 9319207 A1	30-09-1993
			US RE35716 E	20-01-1998
US 6300124	B1	09-10-2001	NONE	
US 5451500	A	19-09-1995	US 5188963 A	23-02-1993
			US 5346672 A	13-09-1994
			US RE35716 E	20-01-1998
			DE 69032410 D1	16-07-1998
			DE 69032410 T2	04-02-1999
			EP 0502108 A1	09-09-1992
			AT 167231 T	15-06-1998
			AU 7787291 A	13-06-1991
			CA 2068891 A1	18-05-1991
			JP 5501647 T	02-04-1993
			WO 9107486 A1	30-05-1991
			US 5436129 A	25-07-1995
			US 5281516 A	25-01-1994

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/00357

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N1/30 G01N1/31 B01L7/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N B01L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 19207 A (GENE TEC CORP) 30. September 1993 (1993-09-30)	11,12
A	Seite 8, Zeile 27 -Seite 12, Zeile 31; Abbildung 5	1-10, 13-19
X	US 6 300 124 B1 (BLUMENFELD MARTIN ET AL) 9. Oktober 2001 (2001-10-09)	11,12
A	das ganze Dokument	1-10, 13-19
X	US 5 451 500 A (STAPLETON MARILYN J) 19. September 1995 (1995-09-19)	11,12
	das ganze Dokument	

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. März 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18/03/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thomte, M

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/00357

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9319207	A	30-09-1993	US 5346672 A 13-09-1994
		US 5281516 A 25-01-1994	
		EP 0632839 A1 11-01-1995	
		WO 9319207 A1 30-09-1993	
		US RE35716 E 20-01-1998	
US 6300124	B1	09-10-2001	KEINE
US 5451500	A	19-09-1995	US 5188963 A 23-02-1993
		US 5346672 A 13-09-1994	
		US RE35716 E 20-01-1998	
		DE 69032410 D1 16-07-1998	
		DE 69032410 T2 04-02-1999	
		EP 0502108 A1 09-09-1992	
		AT 167231 T 15-06-1998	
		AU 7787291 A 13-06-1991	
		CA 2068891 A1 18-05-1991	
		JP 5501647 T 02-04-1993	
		WO 9107486 A1 30-05-1991	
		US 5436129 A 25-07-1995	
		US 5281516 A 25-01-1994	